

09/83141
PCT/JP 99/06197

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

08.11.99^{ESU}

10 MAR 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年11月10日

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第319209号

出 願 人

Applicant (s):

株式会社ナーテック

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月17日

Commissioner
Patent Office

近 藤 隆 彦



【書類名】 特許願

【整理番号】 9811005

【提出日】 平成10年11月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07H
C08B

【発明の名称】 機能性キトサン誘導体

【請求項の数】 10

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県横浜市金沢区長浜2丁目6番地19号

 【氏名】 斎藤 芳夫

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市高津区久本3丁目12番20-702号
 ルネサンスフオルム溝の口

 【氏名】 由良 洋文

【発明者】

 【住所又は居所】 千葉県船橋市夏見台1-2-2-102

 【氏名】 佐伯 史郎

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都立川市一番町6丁目24番18号

 【氏名】 石原 雅之

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県所沢市西新井町17-19 フラワーイン所沢5
 01号

 【氏名】 小野 克明

【特許出願人】

 【識別番号】 596021735

 【氏名又は名称】 株式会社ネーテック

【代理人】

【識別番号】 100060782

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田島 平吉

【電話番号】 03-3585-2256

【選任した代理人】

【識別番号】 100074217

【弁理士】

【氏名又は名称】 江角 洋治

【電話番号】 03-3585-2256

【選任した代理人】

【識別番号】 100103311

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田嶋 平吾

【電話番号】 03-3585-2256

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019666

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 機能性キトサン誘導体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 キチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位の 2 位アミノ基の一部に還元性末端を有する糖類を結合せしめ且つ該 2 位アミノ基の他の一部に光反応性官能基を導入してなる機能性キトサン誘導体。

【請求項 2】 キチン・キトサン類の脱アセチル化度が少なくとも 40%である請求項 1 に記載の機能性キトサン誘導体。

【請求項 3】 還元性末端を有する糖類が構成糖単位の数が 20 個以下の糖類である請求項 1 又は 2 に記載の機能性キトサン誘導体。

【請求項 4】 還元性末端を有する糖類が中性二糖類である請求項 3 に記載の機能性キトサン誘導体。

【請求項 5】 還元性末端を有する糖類の置換度が 0.1～80%である請求項 1～4 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体。

【請求項 6】 光反応性官能基がカルボニルアジド基、スルホニルアジド基又は芳香族アジド基を有するものである請求項 1～5 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体。

【請求項 7】 光反応性官能基の置換度が 0.1～80%である請求項 1～6 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体。

【請求項 8】 還元性末端を有する糖類と光重合性官能基の合計の置換度が 0.2～80%である請求項 1～7 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体。

【請求項 9】 キチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位の 2 位アミノ基のさらに別の一部にポリオキシアルキレンアルキルエーテル又はグリコサミノグリカン類を結合せしめてなる請求項 1～8 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体。

【請求項 10】 請求項 1～9 のいずれかに記載の機能性キトサン誘導体からなるヘルスケア材料。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属するその技術分野】

本発明は新規な機能性キトサン誘導体に関し、さらに詳しくは、医療分野や化粧品分野等において有用な糖側鎖と光反応性官能側鎖を有する機能化されたキトサン誘導体に関する。

【0002】

【従来の技術及び課題】

天然材料は概して組織親和性や生分解性などの生体適合性を有しているため、医療分野や化粧品分野等において広く利用されている。

【0003】

例えば、近年、生体内の糖質の機能に関する研究が活発化し、糖質が細胞の接着、ウイルスの感染などの生体認識に深く係わることが明らかとなってきた。しかし、哺乳類における糖質は、概して、糖蛋白質や糖脂質などの複合体として存在し、その中の一部の糖鎖が特異的な機能発現などに寄与する。このため、このような糖鎖含有物質は高い生理活性を有する場合が多いが、取扱やコスト的な問題が生じてる。

【0004】

一方、植物や海洋生物においては、糖鎖は、生体の骨格を構成する高分子体として存在している。例えば、セルロース、ペクチン、アラビアゴム、ポリガラクトマンナン、アルギン酸などは、植物や褐藻類に含まれており、安価に大量採取することが可能な粘性の高い高分子物質である。また、キチン・キトサン類はカニ・エビなどの甲殻類の殻や昆虫の甲皮などに広く分布し、その構成糖であるグルコサミンは感染や劣化を防御するエリシターとしての役割も果たしている。

【0005】

これらの糖質は、極めて高い分子量を有する多糖体として存在し、同時に高い粘性を有するため、創傷被覆材、人工皮膚、口腔外科又は形成外科領域で用いら

などの点で化学的に修飾することが困難であり、その応用範囲は限られている。

【0006】

多糖類の中でも特徴的なキチン・キトサン類は、構成糖中にアミノ基を含むため、イソシアネート、アルデヒド、カルボジイミドなどの化学的架橋剤と併用して、創傷被覆材、癒着防止材、分解性吸収剤などとして利用することが検討されている。

【0007】

しかしながら、キチン質は水素結合に基づく結晶性により水不溶性で、医療分野を含む広い産業分野で好適に利用するには、加水分解による低分子化や部分脱アセチル化をしなければならない。また、このようなキチン質の物性を改良するために積極的に脱アセチル化を施しアミノ基を露出させた糖単位を増加させたキトサンは、希有機酸などを含む酸性溶媒に可溶であるが極めて粘調であるため、加療処置の現場で良好な操作性を求められる創傷被覆や生体接着では扱いづらいものである。また、粘稠なキトサン溶液は生理的pHを維持しないので、治癒に係わる生理活性試薬などを自在に付加することに制限がある。また、化学的架橋剤の併用には毒性の問題もある。

【0008】

しかして、本発明の主たる目的は、創傷被覆を中心とした様々な臨床的ケースに広く適合させることができる、多機能化されたキトサン誘導体を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意研究を行なった結果、ポリ-N-アセチルグルコサミンが少なくとも部分的に脱アセチル化された構造を有するキチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位の2位アミノ基の一部に、第一機能化として、還元性末端を有する糖類を結合させることによって、キチン・キトサン類のpH依存的な水溶性を改良すると共に、該グルコサミン単位の2位アミノ基の他の一部に、第二機能化として、光反応性官能基を導入することによって、キチン・キトサン類を自己架橋性ならしめることにより、生理的pH領域で水に可溶性であり且つ毒性がなく安全なキトサン誘導体が見出し本発明を完成するに至った。

【0010】

かくして、本発明によれば、キチン・キトサン類を構成するグルコサミン単位
の2位アミノ基の一部に還元性末端を有する糖類を結合せしめ且つ該2位アミノ
基の他の一部に光重合性官能基を導入してなる機能性キトサン誘導体が提供され
る。

【0011】

本発明のキトサン誘導体は、創傷治癒効果や組織癒着防止効果があることが知
られているキチン・キトサン類に、生理的pH領域での水溶性及び光照射による
自己架橋（硬化）性が付与されたものであって、生理的pH領域で安全に生体組
織に適応させることができ、しかも、遊離の化学架橋剤を併用する必要がなく安
全であり、創傷被覆材、癒着防止材、止血材などの医療分野や、肌、毛髪のプロ
テクトなどの化粧品分野等で広く利用することができる。

【0012】

以下、本発明の機能性キトサン誘導体についてさらに詳細に説明する。

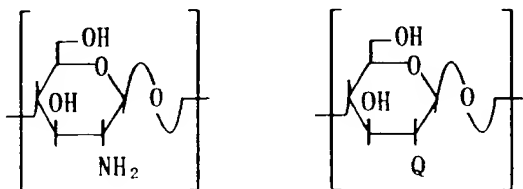
【0013】

【発明の実施の形態】

キチン・キトサン類は、エビやカニ等の甲殻類の殻に由来するキチン質（ポリ
ーN-アセチルグルコサミン）を脱アセチル化することにより得られる酸可溶性
画分であって、一般に下記式（1）、（2）

【0014】

【化1】



式中、QはNHCOCH₃である。

【化1】の構造式は、右に示すように、キチン・キトサン類の繰り返し単位である。

低いもの（通常、40%以下のもの）をキチン、そして脱アセチル化度の比較的高いもの（通常、40%以上のもの）をキトサンと呼び、以下、本明細書では、脱アセチル化されたキチン・キトサン類を総称して「キトサン」という。なお、本発明におけるキトサンは天然由来のものに限らず、化学的又は遺伝工学的に合成されたものであってもかまわない。

【0015】

ここで、「脱アセチル化度」とは、キチン質（ポリ-N-アセチルグルコサミン）を構成する糖単位のうちのアセチルアミノ基が遊離アミノ基に変換されている割合であり、本明細書では、「健康食品規格基準集（その4）」財団法人日本健康・栄養食品協会（1996年）55頁に記載の「コロイド滴定法」によって定量される。

【0016】

本発明のキトサン誘導体は、このキトサンをさらに化学的に修飾することにより多機能化したものであり、原料として使用されるキトサンとしては、脱アセチル化度が少なくとも40%、特に60～100%、さらに特に65～95%の範囲内にあるものが好適である。なお、脱アセチル化度が100%のキトサンは、上記式（1）の構成単位のみからなり、式（2）の構成単位は存在しない。

【0017】

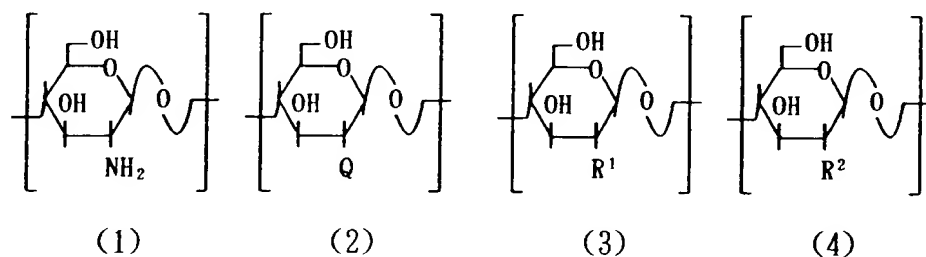
また、該キトサンの分子量には、特に制限はなく、最終のキトサン誘導体の使用目的等に応じて広い範囲で変えることができるが、一般には、数平均分子量が5,000～2,000,000、好ましくは10,000～1,800,000、より好ましくは40,000～1,500,000の範囲内のものが適している。

【0018】

本発明のキトサン誘導体は、上記キトサンを構成する式（1）のグルコサミン単位のうちアミノ基の一部に還元性末端を有する糖類を結合せしめ且つ該アミノ基の他の一部に光重合性官能基を導入したものであって、一般には、下記式（1）、（2）、（3）、（4）

【0019】

【化 2】



式中、R₁は還元性末端を有する糖類残基であり、R₂は光反応性官能基であり、Qは前記定義のとおりである、

で示される4つの構成単位からなり、原料として使用されるキトサンの脱アセチル化度によっては、式(2)の構成単位は存在しないことがあり、及び／又は化学修飾の度合によっては式(1)の構成単位も存在しないことがある。

【0020】

本発明に従い、キトサンの化学的修飾に使用される還元性末端を有する糖類としては、アルドース類、ケトース類が包含され、中でも、構成糖単位の数が20個以下、特に1～7個のものが好適に使用される。具体的には、例えば、グルコース、フルクトース、ガラクトース、フコース、マンノース、アラビノース、キシロース、エリトロース、ヘプツロース、ヘキシロースなどのペンタオースやヘキサオース；グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、ガラクサミンなどのアミノ糖類；ウロン酸類やデオキシ糖類などの糖誘導体；これら単糖類を組合わせた糖鎖からなる、マルトース、イソマルトース、ラクトース、メリビオース、マルトトリオースなどの二もしくは三糖類；各種オリゴ糖類などが挙げられるが、中でも、マルトース、ラクトース、メリビオースなどの中性二糖類が好適である。

【0021】

糖鎖を利用するのが好ましい

【 〃 〃 〃 】

キトサンの前記式(1)のグルコサミン単位の2位アミノ基への上記の糖類の導入は、それ自体既知の方法により、例えば、糖類の還元性末端をカルボキシル化した後、該2位アミノ基にアミド結合により結合させる方法(例えば、特開平10-120705号公報参照)や、糖類の還元性末端をアルデヒド化又はカルボニル化した後、キトサンの式(1)のグルコサミン単位の2位アミノ基に、シッフ塩基を経由する還元アルキル化法により結合させる方法(例えば、キチン・キトサン研究会編「キチン・キトサンの応用」53～56頁、1990年2月20日技報堂出版(株)発行参照)等を用いて行なうことができる。

【0023】

キトサンの式(1)のグルコサミン単位の2位アミノ基に置換しうる糖類は1種のみに限定されるものではなく、2種以上を組み合わせて使用することもできる。

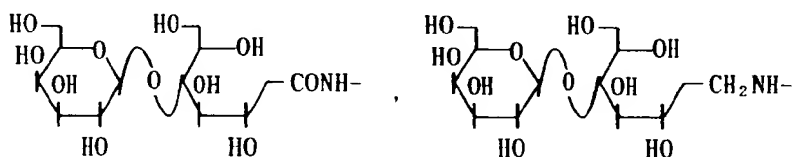
【0024】

しかして、本発明のキトサン誘導体を構成する前記式(3)の構成単位における2位アミノ基の糖側鎖R1の具体例としては、例えば、

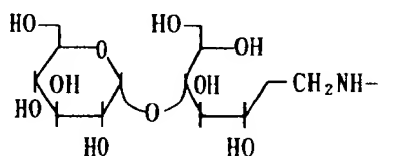
【0025】

【化3】

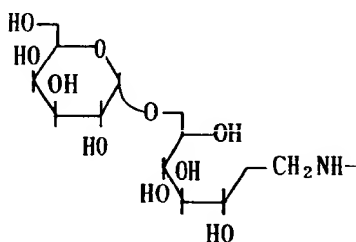
ラクトース
から誘導される



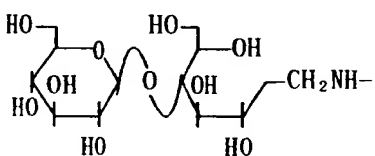
マルトース
から誘導される



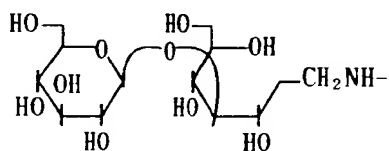
メリビオース
から誘導される



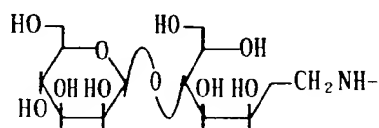
セロビオース
から誘導される



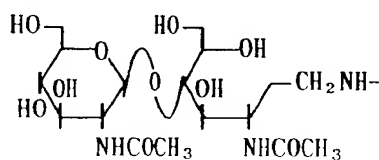
ラミナリビオース
から誘導される



マンノビオース
から誘導される



N-アセチルキトビオース
から誘導される



上記の如くしてキトサンのグルコサミン単位のアミノ基を糖類で置換する
ことは、キトサンを多様な糖質で置換することによって、キトサン誘導体

となる。

【0027】

キトサンのグルコサミン単位の2位アミノ基の糖側鎖による置換の程度は、最終のキトサン誘導体に望まれる物性等に応じて変えることができるが、置換度が一般には0.1～80%、特に0.5～60%、さらに特に1～40%の範囲内にあるのが好適である。ここで、糖側鎖の「置換度」は、キトサンを構成する糖単位の2位のアミノ基が糖側鎖で置換されている程度であり、キトサンを構成する糖単位の2位の遊離アミノ基と置換アミノ基の合計に対する割合として示す。本明細書では、糖側鎖の置換度は、硫酸中で糖鎖がフェノールと反応することに基づく特徴的な発色を490nmの吸光度で検知する「フェノールー硫酸法」によって測定される[J.E.Hodge,B.T.Hofreiter,"Methods in Carbohydrate Chemistry",ed.by R.L.Whistler,M.L.Wolfrom,vol.1,p388,Academic Press,New York(1962)参照]。

【0028】

また、本発明によれば、キトサンを構成する前記式(1)のグルコサミン単位の2位アミノ基の一部に光反応性官能基を導入することによって、キトサンを光照射による自己架橋性が付与される。

【0029】

キトサンに導入可能な光反応性官能基は、紫外線、特に200～380nmの近紫外領域を含む紫外線の照射によって該光反応性官能基同志で及び／又はキトサン中に存在する水酸基等の官能基と反応して架橋結合を形成するような基であり、例えば、ベンゾフェノン類、ケイ皮酸類、アジド類、ジオレフィン類、ビスアントラセンのような環状不飽和化合物などから誘導されるものが包含され、特に、カルボニルアジド基、スルホニルアジド基、芳香族アジド基を有するものが好適である。

【0030】

キトサンのグルコサミン単位の2位アミノ基へのかかる光反応性官能基の導入は、それ自体既知の方法により行なうことができ、例えば、カルボキシル基を有するアジド化合物を縮合剤の存在下に該2位アミノ基に結合させる方法(特開平

10-120705号公報参照) ; 酸クロリド基、アルデヒド基、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル基又はエポキシ基を介してアジド化合物を該2位アミノ基と反応させる方法 (キチン・キトサン研究会編「キチン・キトサンの応用」45~64頁、1990年2月20日技報堂出版(株)発行参照) 等の方法により行なうことができる。

【0031】

なお、従来、アジド基の架橋反応において、ビスアジド以上の多官能性化合物が有効であると提案されているが (特開平9-103481号公報参照)、本発明では、その必要はなく、モノアジド化合物の導入によっても、十分に自己架橋性を有するキトサン誘導体を得られる。

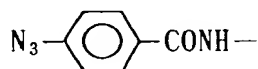
【0032】

しかして、本発明のキトサン誘導体を構成する前記式(4)の構成単位における2位アミノ基に結合した光反応性官能基R₂の具体例としては、例えば、

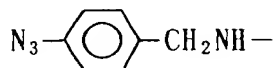
【0033】

【化4】

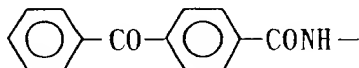
p-アジド
安息香酸から誘導される



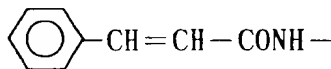
p-アジドベンズアルデヒド
から誘導される



p-ベンゾイル
安息香酸から誘導される



ケイ皮酸
から誘導される



等を挙げることができる。

橋によるゲル化(不溶化)の程度等に応じて変えることができるが、光反応性官能基の架橋度が一定に保たれるように、

0%の範囲内になるようにすることが好ましい。ここで、光反応性官能基の「置換度」は、キトサンを構成する糖単位の2位のアミノ基が光反応性官能基で置換されている程度であり、キトサンを構成する糖単位の2位の遊離アミノ基と置換アミノ基の合計に対する割合である。本明細書では、光反応性官能基、例えばアシド基の置換度は、4-アシド安息香酸の270nmにおける特性吸収から得られる検量線に基づいて決定することができる。

【0035】

本発明のキトサン誘導体における糖側鎖と光反応性官能基の合計の置換度は、特に制限されるものではなく、広い範囲にわたり変えることができるが、一般には0.2~80%、好ましくは1.5~65%、さらに好ましくは3~50%の範囲内とすることができる。

【0036】

本発明の糖側鎖と光重合性官能基の両者が導入された多機能化キトサン誘導体には、さらに、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル又はグリコサミノグリカン類を導入することによって、創傷被覆材に求められる中心的な付加機能である治療促進、保湿、滲出液の速やかな吸収などの機能を付加、増強することができる。

【0037】

治療促進機能は、創傷治療の他スキンケア領域においてケラチノサイトの入れ替わり（ターンオーバー）を促進しシワ防止に寄与し、水分の吸収性は肌や毛髪の保湿効果にもつながる。

【0038】

キトサンは、本来治療促進効果を有することが示唆されているが、天然の酸性ムコ多糖類であるグリコサミノグリカンをキトサンの塩基性基とイオン複合化することによって更なる治療促進が期待できることが報告されている(Kratzら、Scand J Plast Reconstr Hand Surg, 31, 119-123 (1997))。すなわち、治療の過程で生じる肉芽組織を構成する線維芽細胞や平滑筋細胞の増殖を促進する細胞成長因子がグリコサミノグリカン類の硫酸化糖に結合することによって活性化されるというものである。

【0039】

本発明におけるキトサンに対するグリコサミノグリカンの導入は、従来のイオン複合化によるのではなく、前記式(1)のグルコサミン単位の2位アミノ基に対する共有結合的導入によって行われる。その結合法としては、例えば、前述した糖類の導入法と同じ方法を用いることもできるが、一般には、細胞増殖因子が結合する硫酸化糖を保存するため、過ヨウ素酸や亜硝酸分解によってグリコサミノグリカン類に生じるアルデヒド基を介した結合法がより好適に用いられうる。

【0040】

このほか、光照射によって不溶性の自己架橋化したキトサン膜に上記の化学反応を介して結合させることやイオン複合化を介して結合させることも可能である。

【0041】

また、付加機能のひとつである滲出液などの吸収性は、キトサンを構成するグルコサミン単位の2位アミノ基に、疎水性のアルキルブロックと親水性のポリオキシアルキレンブロックから構成される分子量が少なくとも90以上、好ましくは500～10,000のポリオキシアルキレンアルキルエーテルを結合させることによって飛躍的に向上させることができる。このようなポリオキシアルキレンアルキルエーテルは、界面活性剤としての機能を有する場合が多く、疎水性のアルキルブロック(X)と親水性のポリオキシアルキレンブロック(Y)の分子量の割合が、 $X:Y=1:5\sim 5:1$ のものが好適に用いられ、解離性のイオン基を持たない非イオン性のものがより好適に使用できる。この場合、疎水ブロックを持たないポリエーテル類も使用できるが、上記の疎水ブロックと親水ブロックで構成されたポリオキシアルキレンアルキルエーテルをキトサン分子に共有結合したものがより好適である。

【0042】

一方の末端に、アミノ基と反応して共有結合を形成しうる基、例えばアルデヒド基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、チオール基、ヒドロキノン基、ヒドロキ

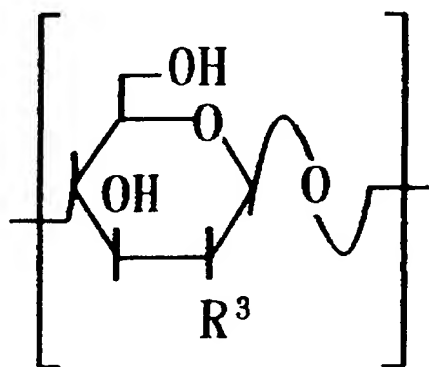
させる方法や、カルボキシル基を有するポリオキシアルキレンアルキルエーテル誘導体とキトサンを結合剤の存在下に反応させる方法等を用いて行なうことができる。

【0043】

かくして、本発明によれば、前記(1)～(4)の4つの構成単位に加えて、さらに下記式(5)

【0044】

【化5】

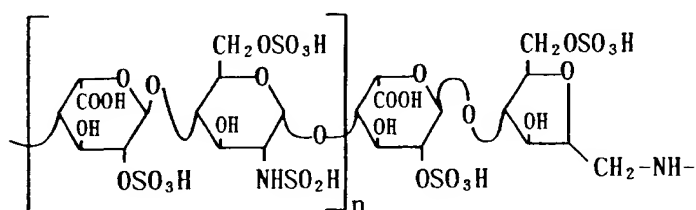
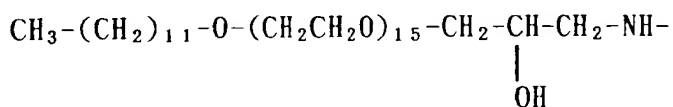


(5)

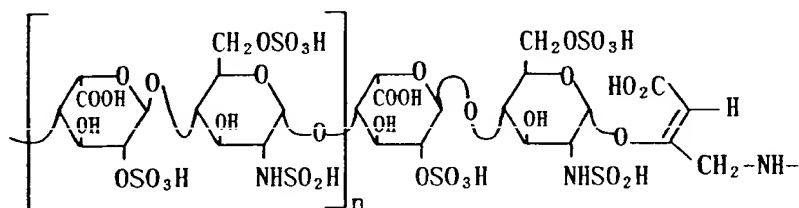
で示される構成単位を含む多機能性キトサン誘導体を得ることができる。ここで、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル又はグリコサミノグリカン側鎖 R^3 としては、例えば、

【0045】

【化6】



(ヘパリン
から誘導)



(ヘパリン
から誘導)

等が挙げられる。

【 0 0 4 6 】

本発明のキトサン誘導体におけるポリオキシアルキレンアルキルエーテル又はグリコサミノグリカン側鎖の導入の程度は、特に制限されるものではないが、導入後のキトサン誘導体の重量に基いてポリオキシアルキレンアルキルエーテルの場合は、通常5～70重量%、好ましくは15～55重量%、そしてグリコサミノグルカンの場合は、通常1～40重量%、好ましくは10～30重量%の範囲内とすることができる。

【 0 0 4 7 】

本発明のキトサン誘導体は、或る程度の創傷治癒、癒着防止、保湿又は抗菌抗果を有するキトサンに、医療分野又は化粧品分野で有用な機能が極めて巧妙に付与された多機能性の新素材であり、ヘルスケア材料として広く利用することができる。

的緩衝液や培地などで溶液化することができ、しかも、光照射による自己架橋性

おける空洞、骨欠損部などに自由に塗布、埋植することができ、短時間の光照射によって直ちに不溶性のゲルを形成し、体液や気体の遮断が可能となる。

【0049】

また、本発明のキトサン誘導体は、繊維製品や樹脂製シートなどに容易に塗布でき光照射によって短時間で不溶化されるので、工業的に安価で機能的な表面改質剤としても利用することができる。このような処理によって癒着防止機能が付与されたガーゼや包袋をつくることができるので、特に熱傷などにおいては創傷保護材の交換時に発生する二次的創傷の発生を効果的に抑制することができる。

【0050】

本発明のキトサン誘導体は、さらに、抗癌剤などの薬物徐放、血管内止血、カテーテルを用いた低侵襲的止血処理、紫外線吸収化粧品に至る極めて広いヘルスケア領域で応用が期待される。

【0051】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

実施例 1(A) pH依存的水溶性を改良された（第一機能化）キトサンの調製

カニ由来のキチンをアルカリ処理によって脱アセチル化されたキトサン（脱アセチル化度80%、分子量100万、焼津水産化学工業株式会社製、（以下「化合物1」という））125gを50mMテトラメチルエチレンジアミン（TEMED）水溶液3リットルに分散させた後56.25mlの塩酸を加えて溶解させた。このキトサン溶液に水溶性カルボジイミド（EDC）32.5gおよびヨウ素酸化したラクトース20.25gを添加し、24時間室温で反応させた。反応液中の未反応の分子量10000以下の物質を限外濾過によって除去し、キトサンを構成するグルコサミン単位の2位アミノ基がラクトースで置換されたキトサン（以下「化合物1-1A」という；ラクトース置換度2%）を得た。また、ヨウ素酸化したラクトースおよびEDCの仕込量を607.5gおよび997.7gにそれぞれ変える以外は上記と同様の方法を用いて、ラクトース置換キトサン（以下「化合物1-1B」という；ラクトース置換度40%）を得た。

【0052】

ヨウ素酸化したラクトース 20.25 g をヨウ素酸化した 20 g のマルトースに変える以外は、上記記載の方法に準じてマルトース置換キトサン（以下「化合物 1-2 A」という；マルトース置換度 0.5%）を得た。また、ヨウ素酸化したマルトースおよび EDC の仕込量を 620 g および 978 g にそれぞれ変える以外は上記と同様の方法を用いて、マルトース置換キトサン（以下「化合物 1-2 B」という；マルトース置換度 24%）を得た。

【0053】

ヨウ素酸化したマルトース 20.25 g をヨウ素酸化した 20 g のメリビオースに変える以外は、上記記載の方法に準じてメリビオース置換キトサン（以下「化合物 1-3 A」という；メリビオース置換度 0.5%）を得た。また、ヨウ素酸化メリビオースおよび EDC の仕込量を 620 g および 978 g にそれぞれ変える以外は同様の方法を用いて、メリビオース置換キトサン（以下「化合物 1-3 B」という；メリビオース置換度 37%）を得た。

(B) 調製されたキトサン誘導体の溶解特性

調製されたキトサン誘導体の 0.1% 水溶液の可溶化範囲を下記表 1 に示す。

【0054】

【表 1】

表 1：可溶化する pH 領域

化合物	pH 領域
1	pH 4.0 以下
1-1 A	pH 7.5 以下
1-1 B	pH 13.0 以下
1-2 A	pH 6.8 以下
1-2 B	pH 13.0 以下
1-3 A	pH 6.8 以下
1-3 B	pH 13.0 以下

る酸依存的なキトサンの水溶性を緩和し、中性領域での可溶性をあまねく獲得し

実施例 2(A) 光硬化性 (第二機能化) キトサンの調製

前記実施例 1 で調製された化合物 1-1A (2%ラクトース置換キトサン) と化合物 1-2A (0.5%マルトース置換キトサン) 1g をそれぞれ 50mM の TEMED 水溶液 100ml に溶解させた。それぞれのキトサン誘導体溶液に EDC 0.35g およびアジド安息香酸 0.2g を添加し 72 時間反応させた。反応液中の未反応の分子量 10000 以下の物質を限外濾過によって除去し、キトサンを構成するグルコサミン単位の 2 位アミノ基がアジドで置換されたキトサン誘導体 (以下「化合物 1-1A-A」および「化合物 1-2A-A」という; アジド安息香酸による置換度はそれぞれ 2.5%) を得た。

(B) 水不溶性の自己構造体の形成能の評価

①ゲル化率

調製された化合物 1-1A-A および化合物 1-2A-A それぞれ 10 μ g を蒸留水に溶かし、1 重量% 水溶液を調製しガラス製の板に置いた。直ちに 10~90 秒紫外線 (200~380nm) 照射した。この後、不溶化したキトサンゲルを 100ml の蒸留水中に 24 時間浸漬して水可溶性のキトサンを溶出させ乾燥した。

【0055】

紫外線照射の前後での重量変化を調べ、ゲル化率を求めた、その結果を下記表 2 に示す。

【0056】

【表 2】

表 2: 光硬化性キトサンの不溶性ゲル化率

照射時間	水洗の残存重量 / 仕込み重量	
	1-1A-A	1-2A-A
10秒	0.61	0.58
30秒	0.99	1.01
60秒	1.00	0.98
90秒	0.99	1.00

表2に示すとおり、実施例1に記載の第一機能化によって中性領域で可溶となったキトサン誘導体は、上記の第二機能化によって30秒という極めて短い紫外線照射でほぼ完全な水不溶性のキトサンハイドロゲルを形成した。また、このような自己架橋性は中性領域で可溶化するために導入された二糖類の種類に依存することがなく、同様の不溶性ゲルの形成、すなわち自己架橋性を示す。

(C) 水不溶性のハイドロゲルの強度の評価

第一及び第二機能化を施した化合物1-1A-Aを用いて、1、3、および5重量%水溶液を調製した。次に、 2×3 cmに裁断された厚さ2 mmの食用ハム2枚を 2×6 cmになるように並べ、2枚のハムの境目を中心に 2×2 cm厚さ2 mmになるように調製した化合物1-1C-A溶液を塗布した。

【0057】

この後、直ちに塗布された化合物1-1A-Aに30秒間紫外線を照射し、2枚のハムを接着させた。接着した2枚のハム的一方をクリップでスタンドに固定し、もう片方のハムの末端に漸次加重をかけ、化合物1-1A-Aが断裂する重量を測定した。

【0058】

比較例として、市販のフィブリン糊（「ベリプラスト」、ヘキスト・マリオン・ルセル社製）を用いて同様の処理を行った。

【0059】

また、直径6 mmのチューブの片端にハムを固定・密着させ6 mmの切れ目を設け、厚さ2 mmの1-1A-Aシールを施し紫外線照射した。チューブの別の片端から空気を送りハムの切れ目から空気が漏れだしたときの圧力を測定した。

【0060】

ゲルが断裂したときの断裂面積あたりの加重と空気が漏れたときの圧力を下記表3に示す。

表3：ハイドロゲルの強度

材料	1-1A-A	
濃度	加重*	圧力**
1%	1.4	4.7
3%	2.8	3.7
5%	4.3	4.3
材料	ペリプラスト	
濃度	加重*	圧力**
4%	4.0	-

*加重： ハムを接着しているゲルが切れたときの、

ゲルの断面積当たりにかかる重量 (10^2 kg/m^2)

** 圧力： 圧縮された空気によってハムの切れ目を塞いでいるゲルからの
空気が漏れだしたときの単位面積当たりの圧力 (Pa)

上記表3に示す結果から明らかなとおり、第一機能化によって中性領域で可溶となったキトサン誘導体は、上記の第二機能化によって短時間の紫外線照射で極めて高い強度の水不溶性のキトサンハイドロゲルを形成した。このとき、全ての条件下で、ハム組織からキトサンゲルが剥離することは観察されなかった。これに対し、対照のペリプラストはハム組織からの剥離も伴った断裂を呈した。

【0062】

また、不溶性キトサンゲルの強度は硬化させる前の水溶液の濃度によって簡単に制御することが可能であった。この強度は、少なくとも市販のフィブリン糊とほぼ同等のものであった。

(D) 毛髪保護作用の評価

前記第二機能化に加え、ベンゾフェノン類であるパラベンゾイル安息香酸とケイ皮酸を導入した別の第二機能化キトサン誘導体を調製した。

【0063】

まず、キトサン 1 g を 50 mM の TEMED 水溶液 100 ml に溶解させた溶液に水溶性カルボジイミド (EDC) 0.7 g、パラベンゾイル安息香酸 0.27 g またはケイ皮酸 0.09 g を添加しそれぞれ 72 時間反応させた。反応液中の未反応の分子量 10000 以下の未反応物を限外濾過によって除去し、キトサ

ンを構成するアミノ糖のアミノ基が 1.3%パラベンゾイル安息香酸あるいは 0.5%ケイ皮酸に置換されたキトサン誘導体（化合物 1-1A-B または 1-1A-K）を得た。これらの 2 種類のキトサン誘導体と前記第二機能化において調製したアジド安息香酸を導入した 1-1A-A の 1:1:1 混合物（化合物 1-1A-ABK）を調製した。

【0064】

ヒト毛髪 0.24 g を市販のシャンプーで洗浄し蒸留水でリンスした。乾燥後、湿度 95%、37℃下で 1 時間放置し、0.1 重量% 1-1A-ABK 水溶液に 10 分間浸漬した。処理した毛髪を濾紙のうえに展開し余剰の水溶液を吸収し 5 分間紫外線照射した。この後、蒸留水に紫外線照射された毛髪を 30 分間浸漬・洗浄し湿度 95%、37℃下で 1 時間放置した。1-1A-ABK 処理の前後の毛髪重量を測定し比較した。対照として、光官能性基を導入していない 1-1A についても同様の評価を行った。結果を表 4 に示す。

【0065】

【表 4】

表 4：毛髪の重量変化

毛髪処理	グラム毛髪当たりの増加重量
1-1A	0.11 g
1-1A-ABK	0.15 g

上記表 4 に示すとおり、本発明の第一機能化及び第二機能化を施したキトサン誘導体は、紫外線を吸収することによって効果的に毛髪表面に不溶・固定化され高い水分保持を達成した。これは、本発明のキトサン誘導体が毛髪に対する保水および紫外線防御効果を持ち、長期コーティングを維持しながら毛髪に艶を与えることを示唆するものである。

溶液を調製した。ウイスター系ラット（雌、4 週齢）をヘントバルビタール麻醉（腹腔内投与）で麻酔し、背に剃毛して清潔な皮膚を露出させた。この皮膚を露出した部分に、

門脈をクリップし出血をふき取り調製したゲルを塗布した。ピンポイント型の紫外線照射装置（スポットキュア、ウシオ電気）で30秒間紫外線照射しクリップをはずし血流を再開した。このような一連の止血処理は1分以内に完了した。この結果、各濃度のキトサン溶液とも紫外線照射によって良好な不溶性のゲル形成を完了し創面からの再出血を完全に阻止した。

【0066】

次に、門脈よりカニューレを挿入し0.5 mMのEDTAを添加した生理的リン酸緩衝液（PBS）をペリスタリックポンプで注入した。直ちに腹部下大静脈を切断することによって肝臓内の血液をPBSで置換した。このとき、PBS置換によって肝臓は黄褐色に変化するが、血流に障害が生じて鬱血している部位はPBS置換が達成されず特有の赤褐色を維持する。

【0067】

本試験では、切開創を本発明のキトサンゲルで止血した部位に若干の赤褐色の鬱血を観察したが、全体的には切開創を設けなかった他の肝組織同様の血液置換が観察できた。

（G）細胞応答の評価

二糖類を導入していないキトサンに、前記方法に準じてアジド安息香酸を2.5%置換し第二機能化のみを施したアジド誘導キトサン（以下「化合物1-A」）、第一及び第二機能化を施した化合物1-1A-Aおよび化合物1-2A-Aの0.1重量%水溶液を調製した。直径35 mmのポリスチレン製の培養皿に調製された各キトサン誘導体溶液を1 mlを添加し2時間静置した。この後溶液を廃棄し5分間紫外線照射し、PBSで3回洗浄した。

【0068】

対象として、0.025重量%ファイブロネクチン（F）及びゼラチン（G）溶液を用いて、培養皿を吸着・コーティングしたものを用意した。また、何物も処理していない未処理の培養皿（N）も同時に用意した。

【0069】

これらの培養皿にヒト臍帯由来の血管内皮細胞（VEC）、新生児皮膚由来線維芽細胞（FIB）、ラット冠状動脈由来平滑筋細胞（SMC）、及び新生児由

来表皮角化細胞 (KER) (ともにクロネティクス社) を 10^6 個播種し、 37°C で 8 時間培養した。このときの細胞付着率を表 5 に示す。

【0070】

【表 5】

表 5 : 培養皿に付着した播種細胞の割合 (%)

処理	VEC	FIB	SMC	KER
N	10	23	21	26
F	47	48	47	48
G	46	44	47	48
1-A	8	10	11	34
1-1A-A	8	5	7	31
1-2A-A	8	4	21	37

表 5 に示すとおり、血管内皮細胞、線維芽細胞、および平滑筋細胞などの内皮系の細胞は、本発明のキトサン誘導体に対し極めて抑制された接着傾向を示したが、上皮系の角化細胞は細胞接着蛋白質であるファイブロネクチンやゼラチンと同様の接着傾向を示した。また、ラクトースを導入した 1-1A-A において、より高い接着抑制傾向が観察された。

【0071】

さらに、培養皿の中央に直径 15 mm の円筒状の隔壁を設け、隔壁の外側をファイブロネクチン、内側をキトサン誘導体 1-A、1-1A-A、または 1-2A-A で処理したものを用意した。外側のファイブロネクチン相に上記の細胞を播種し細胞を接着させた後、隔壁を取り除き長期培養を行ったところ、角化細胞以外は隔壁の内側に処理されたキトサン誘導体処理相に遊走せず、2 週間後も増殖細胞が確認されなかった。このときの細胞の生存率は各培養皿ともすこぶる良好であった。

【0072】

以上述べたように、本発明のキトサン誘導体は、血管内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などの内皮系細胞に極めて低い細胞接着率を示している。このような効果は、特に熱傷などの創傷において被覆材を安全に交換するうえで、血栓の再閉塞を防止するうえで、有効な材料における平滑筋細胞の増殖抑制に効果的である。

増殖による再閉塞を防止することなどに大きく寄与するものと思われる。

【0073】

また、皮膚領域においては、表皮角化細胞の接着と遊走を実現することから、皮膚の再生を活発化し皺を退縮させる美肌効果が期待できる。一方、本発明の第二機能化によって導入できる光官能性基であるアジド基、ベンゾフェノン基、ケイ皮酸などは紫外線を吸収して反応するので紫外線防止に伴う美白効果なども期待できる化粧品原料となりうる。

実施例3

(A) 高含水性（第三機能化）の付与

本発明により機能化されたキトサン誘導体1-1Aまたは1-1A-A 1gを蒸留水10mlに溶解し、11.7gのラウリルアルコールポリエチレングリコール（繰り返し単位が15）グリシジルエーテル（EX-171、ナガセ化成工業）を添加した。80℃、24時間反応させた後、1規定NaOHメタノール溶液を過剰に添加しキトサン成分を再沈殿させた。

【0074】

透析後凍結乾燥させ、含水性を高めた機能化キトサン誘導体（化合物（I）-1-1A、化合物（I）-1-1A-A）を得た。

(B) 含水率の評価

比較例として本発明の第一機能化キトサン誘導体1-1A及び実施例として第三機能化キトサン誘導体（I）-1-1Aと（I）-1-1A-Aの凍結乾燥後の綿状乾燥体1gを100cc容量のフラスコに入れ、蒸留水100mlを添加した。5時間後、水分を吸収してゼリー状の透明ゲル体を形成した後、吸水しきれなかった水分を廃棄し、ゼリー状のゲル体の重量を測定した。その結果を表6に示す。

【0075】

【表6】

表6：キトサン誘導体の吸水量（g）

材料	重量
1-1A	5時間後完全な水溶液 となったため測定不能
(I)-1-1A	75
(I)-1-1A-A	68

表6に示すとおり、本発明の第三機能化によって自重の約70倍の水分を吸収する高含水キトサン誘導体となることが明らかとなった。また、このような含水ゲル化は10秒以内に終了し、測定した5時間以後もゲル体は維持された。さらに(I)-1-1A-Aは、紫外線照射によってより強度の高いゲル体となった。

(C) 血液の固化試験

シトレート-ホスフェート-デキストロース(CPD)を添加した採血されたヒト新鮮血3mlに、本発明によって得られた(I)-1-1A綿状乾燥体0.1gを添加した。(I)-1-1Aはたちまち血液中の水分を吸収し不溶性の含水ゲル体を形成した。これは、第二機能化によって得られた止血効果有する光官能性キトサン誘導体と同等の機能を有することを示唆する。したがって、特に、第三機能化によって得られた高含水性キトサン誘導体は、カテーテルや注射針を用いて血管内に注入されることによって含水膨潤し、効果的に血管の血流を停止できる、すなわち、腫瘍組織に対して誘導された脈管を閉塞させ腫瘍の成長を阻害する局所的ガン治療などに応用できることが期待される。

固相化キトサン誘導体に対する機能化

本発明によって第一機能化及び第二機能化を施されたキトサン誘導体1-1A-Aの0.1重量%水溶液を調製し、ポリウレタンコートされた針金（直径2mm、長さ5cm、川澄化学工業）を24時間浸漬した。この後、直ちに5分間紫

反応させた。反応後、エタノール、蒸留水で洗浄し表面処理されたポリウレタン綿1-1A-A-(I)を得た。

【0076】

調製された1-1A-A-(I)処理ポリウレタン線を生理食塩液に30秒漬けた後、 2 kg/cm^2 に調整したエア圧式掴み具にて潤滑処理部2cmを、1mm厚のシリコンシートを介してはさみ（未処理部は直接）、200mm/分にて引っ張ったときの最大荷重により、処理線の潤滑性を評価した。対象として、未処理のポリウレタン線（N）とEX-171処理していないポリウレタン線（1-1A-A）も同時に測定した。その結果を表7に示す。

【0077】

【表7】

表7：ポリウレタン線の引き抜き荷重

処理	引抜き荷重(kgf)
(N)	2.00
1-1A-A	0.96
1-1A-A-(I)	0.18

上記表7に示すとおり、本発明の機能化キトサンは、樹脂表面に容易に薄膜加工することが可能で、更なる機能化を施すことによって容易に樹脂表面の物性を改良せしめることが示された。このような潤滑性の付与は、カテーテルやガイドワイヤーの表面処理に好適に使用できることを示唆するものである。

【0078】

また、上記の表面処理において、第三機能化として導入するEX-171の代わりに酸分解ヘパリンを導入した。公知の亜硝酸分解法によって還元末端にアルデヒド基を誘導し、低分子化したヘパリン分画をゲル濾過によって得た。上記の1-1A-Aを蒸留水に溶解させ最終濃度が1重量%になるようにジメチルスルホキシドを添加しキトサン誘導体濃度1重量%の混合溶液を調製した。この混合溶液を内径5mm、長さ5cmの塩化ビニル製チューブの内部を満たし、24時間チューブの外部から紫外線照射した後、内部の未反応の溶液を廃棄し蒸留水で洗浄した。1mlの蒸留水に低分子化ヘパリン10mgとシアノ水素化ホウ素ナトリウム50mgを添加した水溶液を調製し、洗浄したキトサン誘導体処理チューブに充填した。50℃で24時間反応させた後、チューブ内を0.01%TW

EEN 20 溶液で置換し、エタノールと蒸留水で洗浄しヘパリン化塩化ビニルチューブ (1-1A-A-(H)) を得た。

【0079】

ヘパリンと結合して複合体を形成する 0.0008% トルイジンブルー水溶液でヘパリン処理チューブ内を満たし、ヘパリンに結合したトルイジンブルーの吸光度の変化を 640 nm で測定した。さらに、対象として、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加しない場合のチューブ (1-1A-A/(H)) 内の吸光度変化も同時に測定した。その結果を表 8 に示す。

【0080】

【表 8】

表 8 : トルイジンブルーの吸光度変化

表面処理	吸光度
なし	0.19
1-1A-A/(H)	0.16
1-1A-A-(H)	0.06

上記表 8 に示すとおり、本発明の機能化キトサンは、樹脂表面に容易に薄膜加工することが可能で、更なる機能化を施すことによって容易に樹脂表面の物性を改良せしめることが示された。このようなヘパリン分子の導入は、血液に触れるようなカテーテル、ガイドワイヤー、体外循環回路などの医療機器の表面処理に好適に使用しうる。また、創傷被覆材においては、ヘパリンによる FGF などの細胞成長因子の活性化が達成されるので、創傷治癒促進効果が期待される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は化合物 1-1A-A の IR スペクトルである。

2250 cm^{-1} にアジド基 ($-\text{N}_3$) の吸収が認められる。

7.2 及び 7.6 ppm にベンゼン環のピークが認められる

【図 2】

図3は化合物1-1A-AのUVスペクトルである。

271 nmにピークが認められる。

【図4】

図4は化合物1-1A-KのUVスペクトルである。

278 nmにピークが認められる。

【図5】

図5は化合物1-1A-BのUVスペクトルである。

262 nmにピークが認められる。

【図6】

図6は化合物(I)-1-1AのIRスペクトルである。

840 cm^{-1} に長鎖アルキル基のメチレン横ゆれ吸収が認められる。

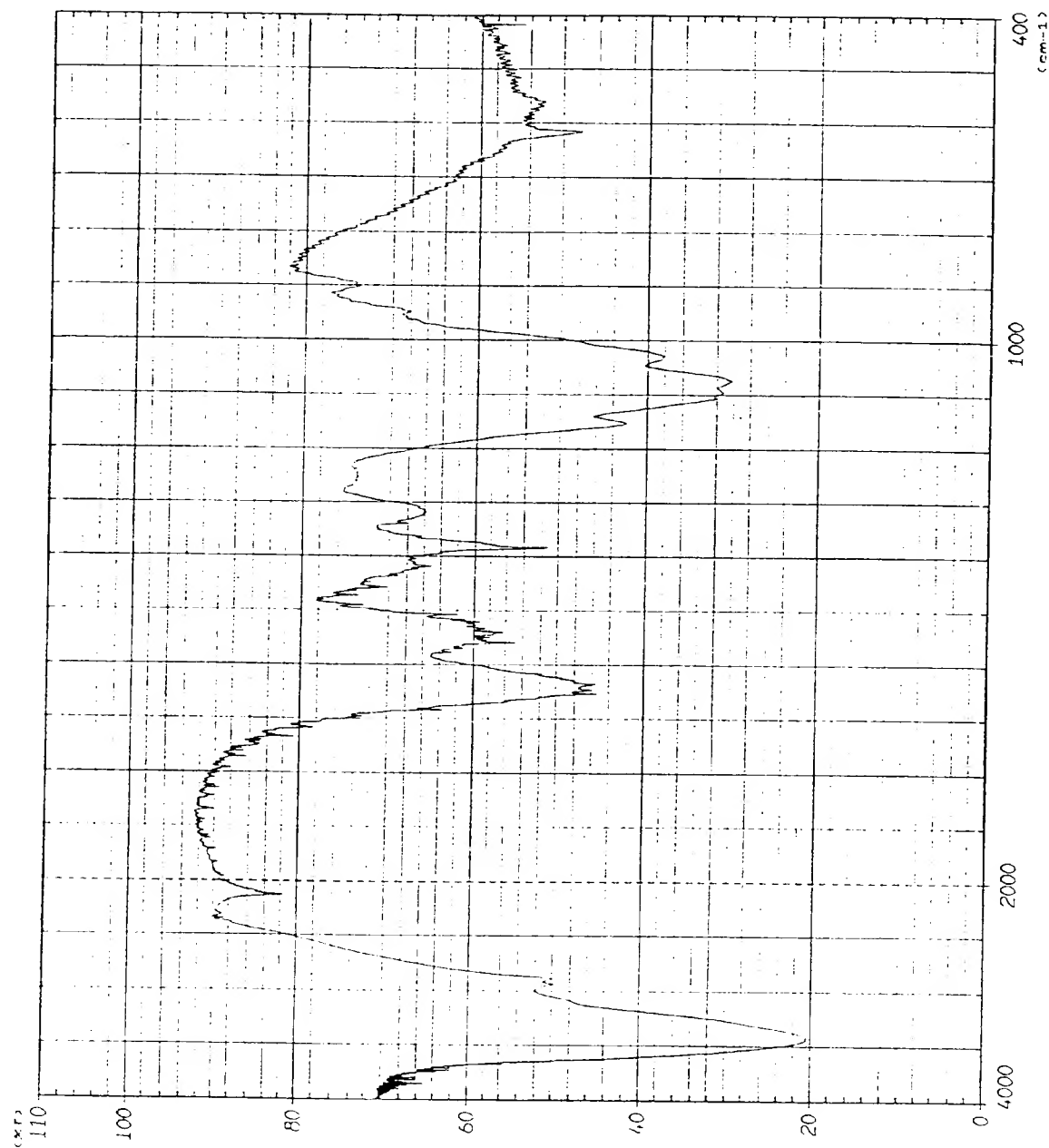
【図7】

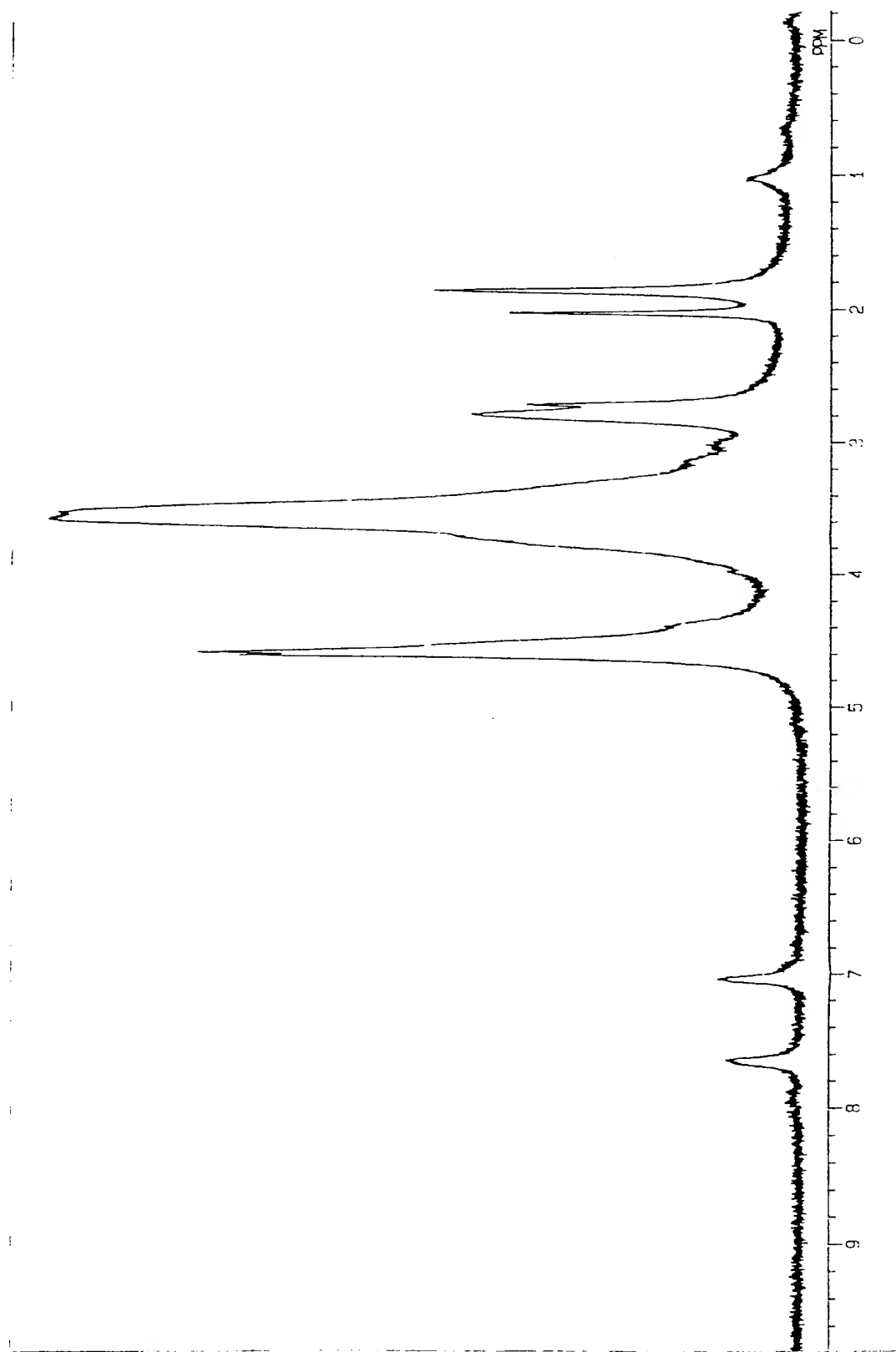
図7は化合物(I)-1-1A-AのIRスペクトルである。

2250 cm^{-1} にアジド基の吸収、840 cm^{-1} に長鎖アルキル基のメチレン横ゆれ吸収が認められる。

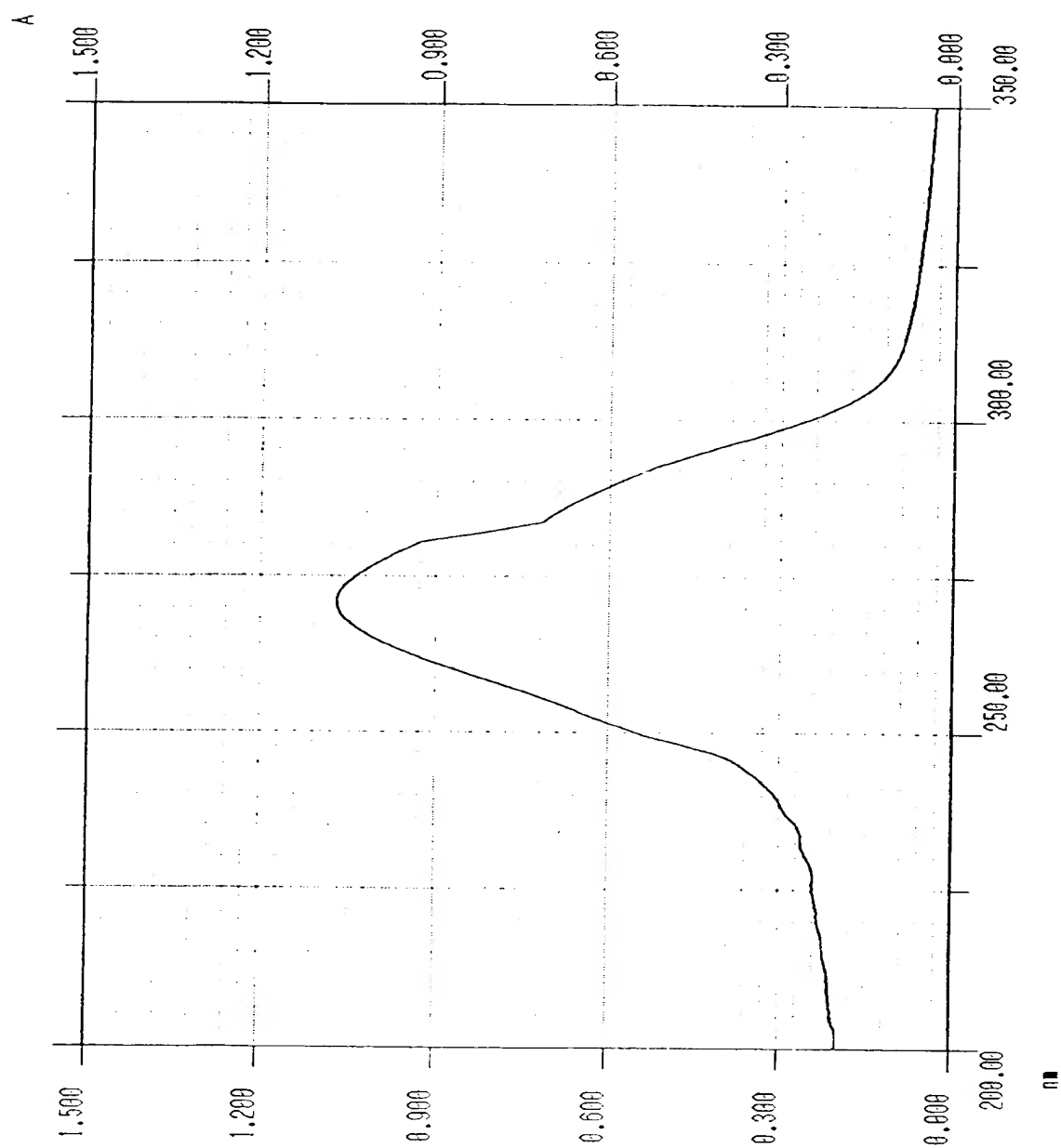
【書類名】 図面

【図1】

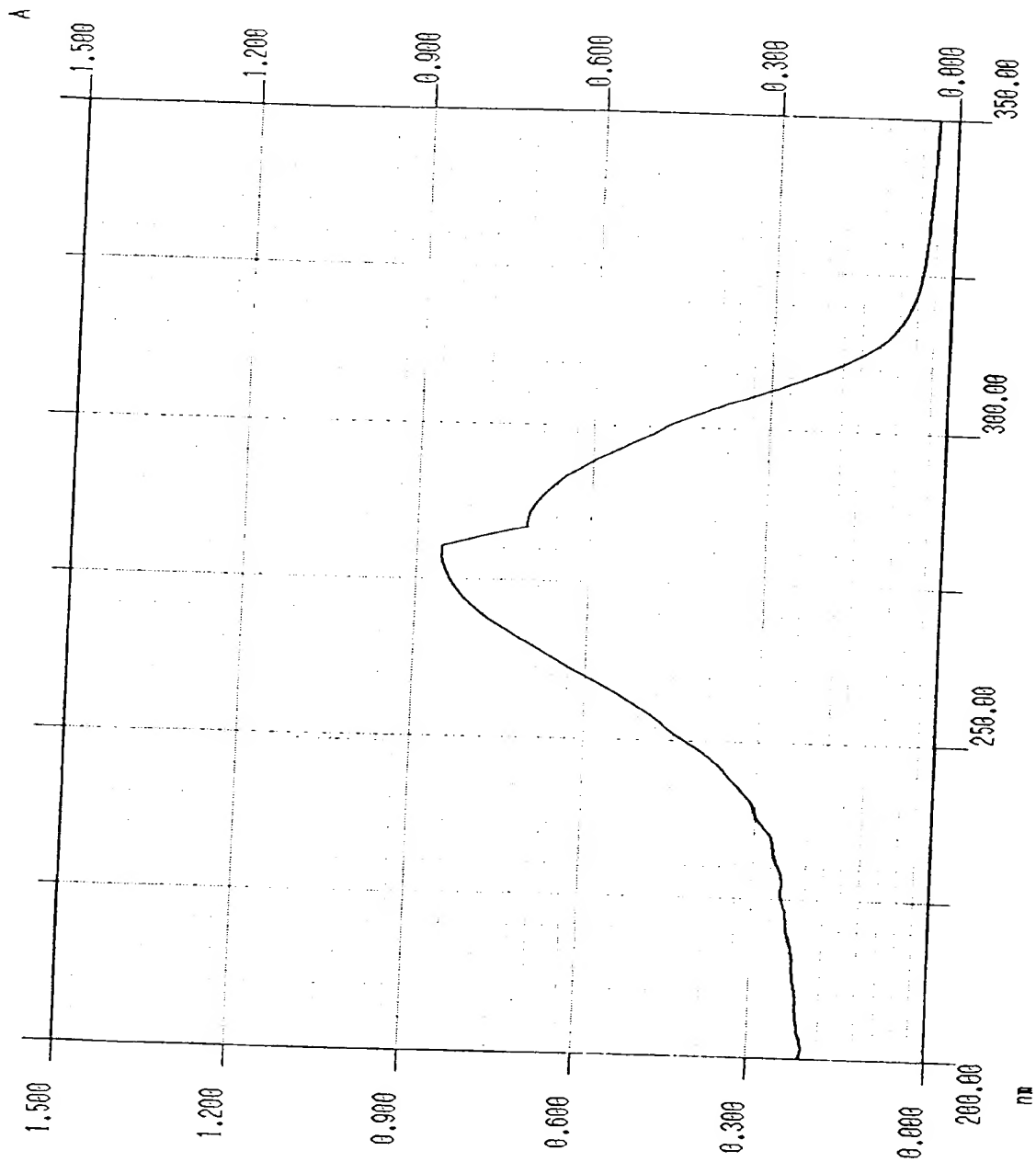




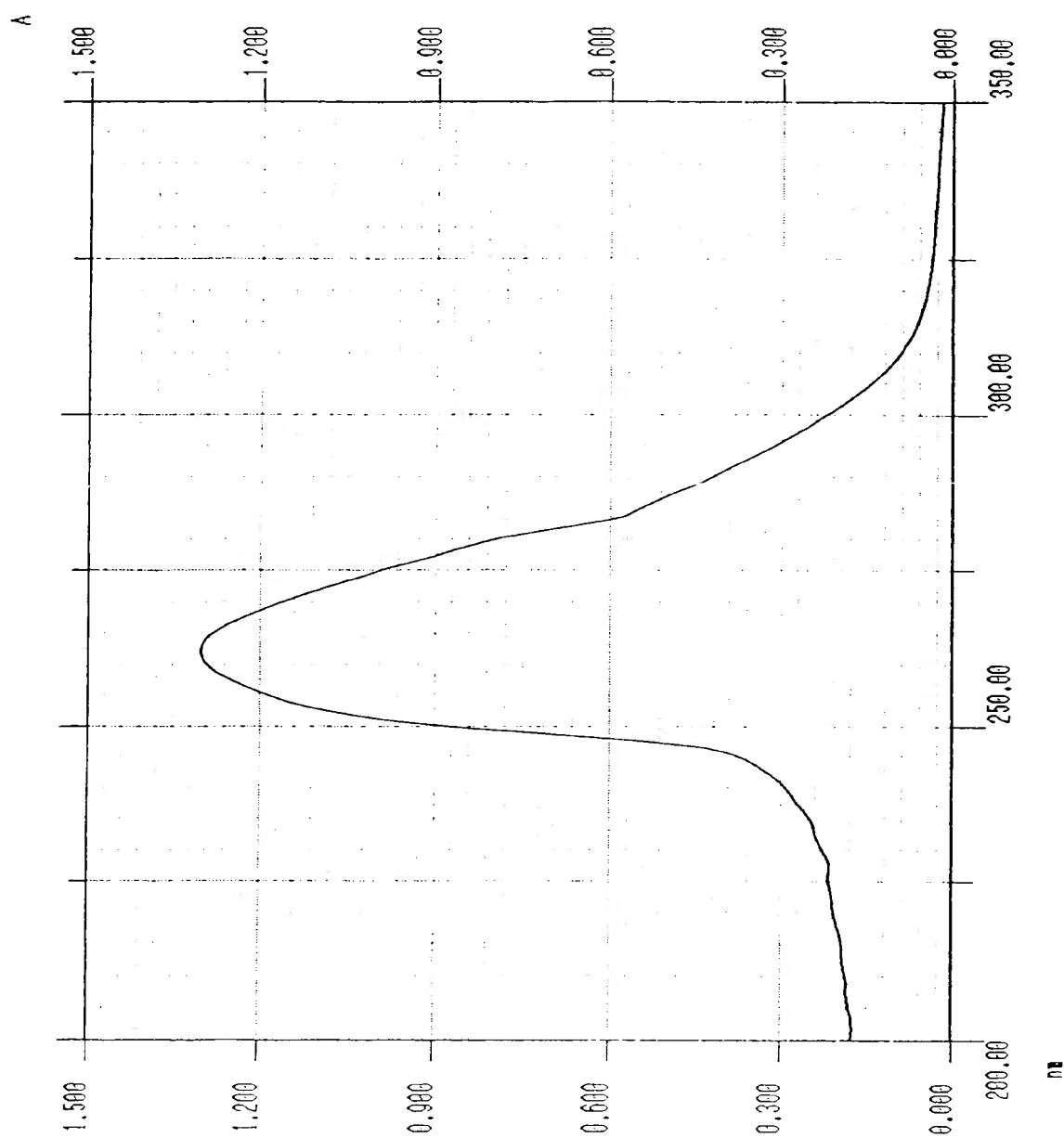
【図3】



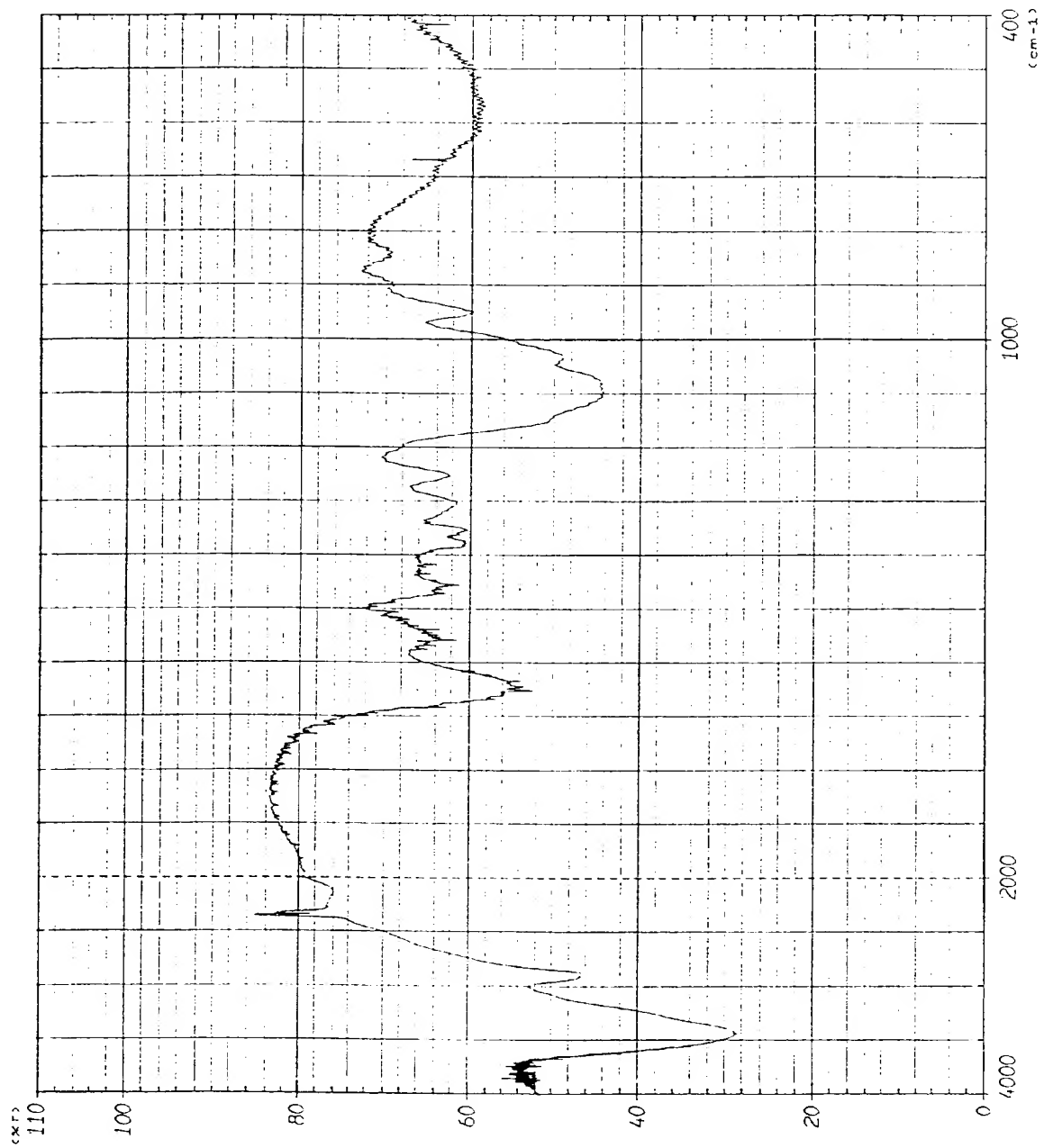
【图 4】



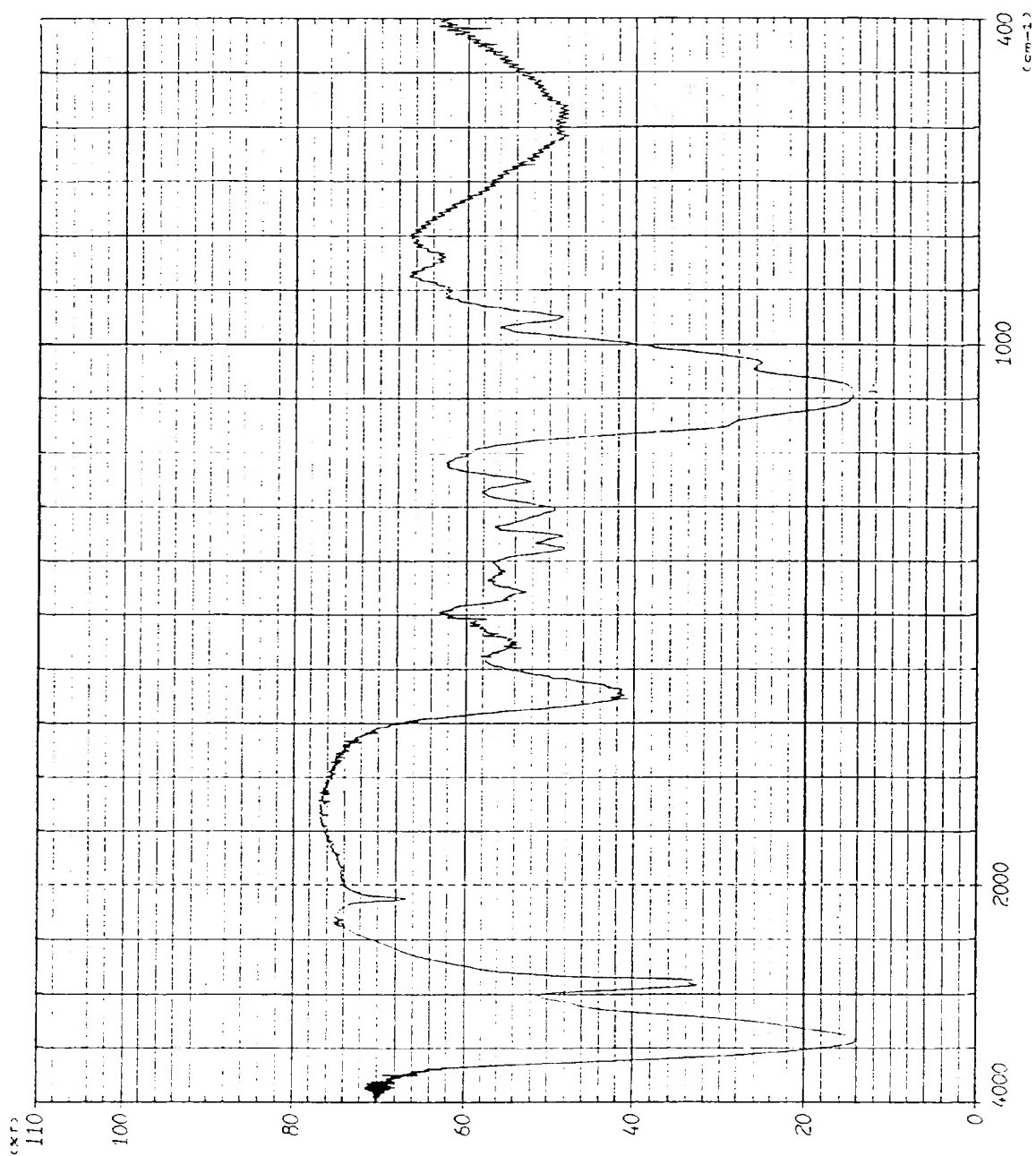
【図5】



【图6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 多機能性が付与されたキトサン誘導体を提供すること。

【解決手段】 天然由来の多糖類であるキチン・キトサン類に、第一機能化として別の糖類を導入することにより pH 依存的な水溶性を改良し、第二機能化として光重合性官能基を導入することにより自己架橋性の機能を付与し、さらに場合により第三機能化としてポリオキシアルキレンアルキルエーテル又はグリコサミノグリカン類を導入することにより求められる機能を増強してなる多機能性キトサン誘導体。

【書類名】 職権訂正データ
 【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 596021735
 【住所又は居所】 神奈川県川崎市高津区坂戸 3-2-1 K S P 東-304

【氏名又は名称】 株式会社ネーテック

【代理人】 申請人

【識別番号】 100060782
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂 1-9-15 日本自転車会館内
 【氏名又は名称】 小田島 平吉

【選任した代理人】

【識別番号】 100074217
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂 1-9-15 日本自転車会館内
 小田島特許事務所

【氏名又は名称】 江角 洋治

【選任した代理人】

【識別番号】 100103311
 【住所又は居所】 東京都港区赤坂 1丁目9番15号 日本自転車会館
 【氏名又は名称】 小田嶋 平吾

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [596021735]

1. 変更年月日 1996年 2月16日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県川崎市高津区坂戸3-2-1 KSP東-304

氏 名 株式会社ネーテック